

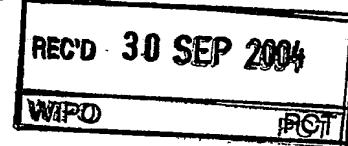
日本国特許庁
JAPAN PATENT OFFICE

10.08.2004

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されて
いる事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed
with this Office.

出願年月日 2003年 8月 5日
Date of Application:



出願番号 特願2003-287208
Application Number:
[ST. 10/C]: [JP2003-287208]

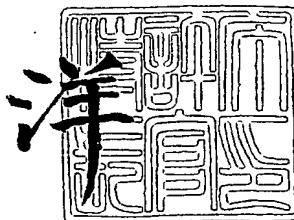
出願人 伊東 恭悟
Applicant(s):

PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

2004年 9月16日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

小川



【書類名】 特許願
【整理番号】 NP03-1109
【あて先】 特許庁長官殿
【国際特許分類】 A61K 38/04
【発明者】
【住所又は居所】 佐賀県三養基郡基山町けやき台2丁目25番地9号
【氏名】 伊東 恭悟
【特許出願人】
【識別番号】 596094371
【氏名又は名称】 伊東 恭悟
【代理人】
【識別番号】 100088904
【弁理士】
【氏名又は名称】 庄司 隆
【電話番号】 03-3864-6572
【手数料の表示】
【予納台帳番号】 067070
【納付金額】 21,000円
【提出物件の目録】
【物件名】 特許請求の範囲 1
【物件名】 明細書 1
【物件名】 図面 1
【物件名】 要約書 1
【包括委任状番号】 0101402

【書類名】特許請求の範囲**【請求項 1】**

配列表の配列番号 1、2、3、4、5、6、7、8、9 または 10 に記載のアミノ酸配列からなるペプチドの少なくとも 1 つを有効成分として含有する造血器腫瘍の予防および／または治療剤。

【請求項 2】

配列表の配列番号 1、2、4、5、8 または 10 に記載のアミノ酸配列からなるペプチドの少なくとも 1 つを有効成分として含有する造血器腫瘍の予防および／または治療剤。

【請求項 3】

請求項 2 に記載の造血器腫瘍の予防および／または治療剤に、さらに配列表の配列番号 3、6、7 または 9 に記載のアミノ酸配列からなるペプチドの少なくとも 1 つを有効成分として含有する造血器腫瘍の予防および／または治療剤。

【請求項 4】

配列表の配列番号 1、2 または 4 に記載のアミノ酸配列からなるペプチドの少なくとも 1 つを有効成分として含有する造血器腫瘍の予防および／または治療剤。

【請求項 5】

配列表の配列番号 2、4 または 10 に記載のアミノ酸配列からなるペプチドの少なくとも 1 つを有効成分として含有する造血器腫瘍の予防および／または治療剤。

【請求項 6】

配列表の配列番号 5 または 8 に記載のアミノ酸配列からなるペプチドの少なくとも 1 つを有効成分として含有する造血器腫瘍の予防および／または治療剤。

【請求項 7】

アジュバントをさらに含む請求項 1 から 6 のいずれか 1 項に記載の造血器腫瘍の予防および／または治療剤。.

【請求項 8】

造血器腫瘍が HLA-A24 分子を細胞表面上に有する造血器腫瘍である請求項 1 から 7 のいずれか 1 項に記載の予防および／または治療剤。

【請求項 9】

造血器腫瘍が HLA-A24 分子を細胞表面上に有し且つ予防および／または治療剤の有効成分であるペプチドを含む蛋白質を発現している造血器腫瘍である請求項 1 から 7 のいずれか 1 項に記載の予防および／または治療剤。

【請求項 10】

配列表の配列番号 1、2、4、5、8 または 10 に記載のアミノ酸配列からなるペプチドとアジュバントとからなる、HLA-A24 分子を細胞表面上に有する造血器腫瘍に用いる造血器腫瘍の予防および／または治療剤。

【請求項 11】

造血器腫瘍用癌ワクチンとして用いることを特徴とする請求項 1 から 10 のいずれか 1 項に記載の造血器腫瘍の予防および／または治療剤。

【請求項 12】

治療に有効な用量の配列表の配列番号 1、2、4、5、8 または 10 に記載のアミノ酸配列からなるペプチドをアジュバントとともに投与することを特徴とする、HLA-A24 分子を細胞表面上に有する造血器腫瘍の予防および／または治療方法。

【書類名】明細書

【発明の名称】造血器腫瘍の予防および／または治療剤

【技術分野】

【0001】

本発明は、ペプチドを有効成分として含有する造血器腫瘍の予防および／または治療剤に関する。より詳しくは、細胞傷害性T細胞を誘導し得るペプチドを有効成分として含有する造血器腫瘍の予防および／または治療剤、造血器腫瘍用癌ワクチンとして使用する該造血器腫瘍の予防および／または治療剤、並びに該ペプチドを投与することを特徴とする造血器腫瘍の予防および／または治療方法に関する。

【背景技術】

【0002】

造血器腫瘍の治療には従来、非特異的な化学療法が行われてきた。また、同種骨髄移植や自己末梢血幹細胞移植等による治療も実施されている。しかし、化学療法は合併する有害事象の問題があり、同種骨髄移植や自己末梢血幹細胞移植には拒絶反応の問題やドナー確保の問題がある。また、これらの療法は、若年者においては高い効果が得られているが、癌の多発年齢層である中高齢者では、副作用の影響により必ずしも高い効果を得られていない。

【0003】

近年、より副作用の少ない治療法として、悪性腫瘍の分子メカニズムに基づく分子標的療法が注目されている。この療法によれば、分子標的剤が癌細胞に選択的且つ効率的に作用し、正常細胞への影響が少ないため、副作用が少なく且つ高い効果が得られることが多い。しかし、造血器腫瘍は全身性疾患であるため、分子標的療法によっても必ずしも高い効果が得られない。

【0004】

かかる現状において、造血器腫瘍に対する有効性が高く且つ副作用の少ない治療法の開発が期待されている。

【0005】

悪性腫瘍に対する治療法の1つとして免疫療法が開発されている。例えば、腫瘍抗原ペプチドを用いた特異的免疫療法は、悪性腫瘍、特に悪性黒色腫においてその有効性が報告されている（非特許文献1～6）。例えば欧米では、腫瘍抗原投与により癌患者の体内的細胞傷害性T細胞を活性化させる癌ワクチン療法の開発がなされつつあり、メラノーマ特異的腫瘍抗原については臨床試験における成果が報告されている。

【0006】

造血器腫瘍に対する免疫療法としては数種の治療方法が提案されている。例えば、放射線照射した自己白血病細胞によるワクチン療法が知られている。また、Bc1/a b1変異抗原やPML/RAR α 変異抗原はそれぞれ急性骨髄性白血病（chronic myelogenous leukemia、以下CMLと略称する。）および急性前骨髄球性白血病に対するT細胞免疫療法の標的と見られている（非特許文献7および8）。免疫グロブリン由来ペプチドはB細胞腫瘍細胞に対するT細胞反応の標的となり得ると考えられている（非特許文献1および9）。白血病関連抗原、例えば、CMLにおけるプロティナーゼ3（非特許文献10）、リンパ腫におけるALK、および白血病におけるウイルムス抑制遺伝子WT1等についても特異的免疫療法への利用可能性が報告されている（非特許文献8および11）。

【0007】

造血器腫瘍に対する免疫療法においては数例の腫瘍退縮が報告されているのみであり、ほとんどの癌患者においては腫瘍特異的免疫応答は得られず、現在のところその臨床効果は限られたものである。

【0008】

以下に本明細書において引用した文献を列記する。

【特許文献1】国際公開WO01/011044号パンフレット。

【非特許文献1】ベンダンディら (Bendandi, M. et al.)、「ネイチャー メディシン (Nature Medicine)」、1999年、第5巻、p. 1171-1177。

【非特許文献2】トロージャン (Trojan, A. et al.)、「ネイチャー メディシン (Nature Medicine)」、2000年、第6巻、p. 667-672。

【非特許文献3】キクチら (Kikuchi, M. et al.)、「インターナショナル ジャーナル オブ キャンサー (International Journal of Cancer)」、1999年、第81巻、p. 459-466。

【非特許文献4】ヤングら (Yang, D. et al.)、「キャンサー リサーチ (Cancer Research)」、1999年、第59巻、p. 4056-4063。

【非特許文献5】ナカオら (Nakao, M. et al.)、「ジャーナル オブ イムノロジー (Journal of Immunology)」、2000年、第164巻、p. 2565-2574。

【非特許文献6】ニシザカラ (Nishizaka, S. et al.)、「キャンサー リサーチ (Cancer Research)」、2000年、第60巻、p. 4830-4837。

【非特許文献7】ピニッラら (Pinilla-Ibarz, J. et al.)、「ブラッド (Blood)」、2000年、第95巻、p. 1781-1787。

【非特許文献8】アップベルバウム (Appelbaum, F. R.)、「ネイチャー (Nature)」、2001年、第411巻、p. 385-389。

【非特許文献9】スーら (Hsu, F. J. et al.)、「ブラッド (Blood)」、1996年、第89巻、p. 3129-3135。

【非特許文献10】モルドレムら (Moldrem, J. et al.)、「ブラッド (Blood)」、1997年、第88巻、p. 2450-2457。

【非特許文献11】パソニーラ (Passoni, L. et al.)、「ブラッド (Blood)」、2002年、第99巻、p. 2100-2106。

【非特許文献12】ハラシマら (Harashima, N. et al.)、「ヨーロピアン ジャーナル オブ イムノロジー (European Journal of Immunology)」、2001年、第31巻、p. 323-332。

【非特許文献13】ミヤギら (Miyagi, Y. et al.)、「クリニカル キャンサー リサーチ (Clinical Cancer Research)」、2001年、第7巻、p. 3950-3962。

【非特許文献14】イトウら (Ito, M. et al.)、「キャンサー リサーチ (Cancer Research)」、2001年、第61巻、p. 2038-2046。

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0009】

本発明の課題は、造血器腫瘍の免疫療法に有用な標的分子を見出し、造血器腫瘍の予防および/または治療を可能にする手段を提供することである。

【課題を解決するための手段】

【0010】

本発明者らは、ペプチド特異的であり且つ腫瘍反応性の細胞傷害性T細胞 (cytotoxic T lymphocytes) を上皮癌患者の末梢血単核細胞 (peripheral blood mononuclear cells、以下PBMCと略称する。) から誘導し得る一連の上皮癌関連抗原および該抗原由来のペプチドを同定し既に報告している (特許文献1、非特許文献3~6および12)。さらに、これらペプチドを用いたワクチン接種が、種々の上皮癌患者において免疫能および臨床反応の亢進に有効である

ことを明らかにした（非特許文献13）。

【0011】

本発明者らは、上記課題解決のため鋭意研究を重ね、既に報告した上皮癌関連抗原のいくつかが造血器腫瘍細胞株で発現していること、さらに該抗原由来ペプチドのワクチン接種により造血器腫瘍患者において悪性腫瘍細胞反応性細胞傷害性T細胞を誘導し得ることを見出し、本発明を完成した。白血病関連抗原による造血器腫瘍患者由来PBM Cからの細胞傷害性T細胞誘導については報告があるが（非特許文献10）、造血器腫瘍患者における上皮癌関連抗原による細胞傷害性T細胞誘導およびペプチドワクチンの効果については今まで報告されていない。

【0012】

すなわち、本発明は、

1. 配列表の配列番号1、2、3、4、5、6、7、8、9または10に記載のアミノ酸配列からなるペプチドの少なくとも1つを有効成分として含有する造血器腫瘍の予防および／または治療剤、

2. 配列表の配列番号1、2、4、5、8または10に記載のアミノ酸配列からなるペプチドの少なくとも1つを有効成分として含有する造血器腫瘍の予防および／または治療剤、

3. 前記2. の造血器腫瘍の予防および／または治療剤に、さらに配列表の配列番号3、6、7または9に記載のアミノ酸配列からなるペプチドの少なくとも1つを有効成分として含有する造血器腫瘍の予防および／または治療剤、

4. 配列表の配列番号1、2または4に記載のアミノ酸配列からなるペプチドの少なくとも1つを有効成分として含有する造血器腫瘍の予防および／または治療剤、

5. 配列表の配列番号2、4または10に記載のアミノ酸配列からなるペプチドの少なくとも1つを有効成分として含有する造血器腫瘍の予防および／または治療剤、

6. 配列表の配列番号5または8に記載のアミノ酸配列からなるペプチドの少なくとも1つを有効成分として含有する造血器腫瘍の予防および／または治療剤、

7. アジュバントをさらに含む前記1. から6. のいずれかの造血器腫瘍の予防および／または治療剤、

8. 造血器腫瘍がHLA-A24分子を細胞表面上に有する造血器腫瘍である前記1. から7. のいずれかの予防および／または治療剤、

9. 造血器腫瘍がHLA-A24分子を細胞表面上に有し且つ予防および／または治療剤の有効成分であるペプチドを含む蛋白質を発現している造血器腫瘍である前記1. から7. のいずれかの予防および／または治療剤、

10. 配列表の配列番号1、2、4、5、8または10に記載のアミノ酸配列からなるペプチドとアジュバントとからなる、HLA-A24分子を細胞表面上に有する造血器腫瘍に用いる造血器腫瘍の予防および／または治療剤、

11. 造血器腫瘍用癌ワクチンとして用いることを特徴とする前記1. から10. のいずれかの造血器腫瘍の予防および／または治療剤、

12. 治療に有効な用量の配列表の配列番号1、2、4、5、8または10に記載のアミノ酸配列からなるペプチドをアジュバントとともに投与することを特徴とする、HLA-A24分子を細胞表面上に有する造血器腫瘍の予防および／または治療方法、からなる。

【発明の効果】

【0013】

本発明によれば、上皮癌関連抗原由来のペプチドを有効成分として含有する造血器腫瘍の予防および／または治療剤を提供可能である。本発明に係る造血器腫瘍の予防および／または治療剤は、その使用の1態様として癌ワクチンとして用いることができる。本発明に係る造血器腫瘍の予防および／または治療剤は、造血器腫瘍患者において腫瘍を標的とする細胞傷害性T細胞を誘導することができるため、造血器腫瘍の特異的免疫療法に用いることができる。例えばHLA-A24陽性造血器腫瘍、さらにHLA-A24陽性であ

り且つ予防および／または治療剤の有効成分であるペプチドを含む蛋白質を発現する造血器腫瘍の予防および／または治療に有用である。HLA-A24対立遺伝子は多くの人種において頻度高くみられる遺伝子であり、アジア人の人口の約60%、白人の約20%、ラテンアメリカ人および黒人の約40%がこの対立遺伝子を有する。したがって、本発明は多数の造血器腫瘍患者においてその有用性が期待できる。また、本発明に係る造血器腫瘍の予防および／または治療剤は副作用が少ないかほとんど観察されず、この観点からも有効な予防および／または治療手段である。

【発明を実施するための最良の形態】

【0014】

本発明の1態様は、被検体における造血器腫瘍に対する抗腫瘍免疫応答を誘発することを機能的特徴とする造血器腫瘍の予防および／または治療剤に関する。抗腫瘍免疫応答とは、腫瘍に対して惹起される免疫応答を意味し、主に細胞傷害性T細胞が関与する。すなわち、本発明においては、被検体において造血器腫瘍に対する細胞傷害性T細胞を誘導し得る医薬を提供する。ここで被検体には、造血器腫瘍患者、造血器腫瘍患者から採取した血液、および造血器腫瘍患者の血液から調製した白血球分画等が含まれる。

【0015】

本発明において造血器腫瘍の予防および／または治療剤とは、例えば、造血器腫瘍の発生を予防する作用を有する医薬、造血器腫瘍の進行・増悪を抑制する作用を有する医薬、血液中の白血球数の減少等造血器腫瘍の病態を改善する効果を示す医薬を意味するものである。

【0016】

本発明に係る造血器腫瘍の予防および／または治療剤は、その使用の1態様として癌ワクチンとして用いることができる。ここでいう癌ワクチンとは、腫瘍細胞に対する特異的免疫応答の誘導および／または増強により、癌患者の体内の細胞傷害性T細胞を活性化させて腫瘍細胞を選択的に傷害する薬物を意味する。

【0017】

本発明においては、上皮癌関連抗原ペプチドを造血器腫瘍患者にワクチン接種することにより、該患者において造血器腫瘍細胞を標的とする細胞傷害性T細胞をHLA-A24拘束性に誘導することができ、さらに腫瘍細胞の減少を伴う臨床効果を得ることができた。上皮癌関連抗原ペプチドについては、上皮癌患者のPBMCからペプチド特異的細胞傷害性T細胞をHLA-A24拘束性に誘導するが既に報告されている（非特許文献3～6および12）。ここで「ペプチド特異的細胞傷害性T細胞をHLA-A24拘束性に誘導する」とは、「細胞表面上に発現された主要組織適合性抗原であるヒト白血球抗原（human leukocyte antigen）分子によって提示されたあるペプチドを認識するが、同様に提示されたそれ以外のペプチドはほとんどあるいは全く認識しない細胞傷害性T細胞」を、「HLAクラスI表現型がA24であるHLAクラスI分子によるペプチドの提示により誘導する」ことを意味する。

【0018】

ワクチン接種は、多発性骨髄腫患者例（実施例4参照）において、p56^{1c k}蛋白質由来のペプチドであるLck₄₈₈（配列番号2）、SART-1由来のペプチドであるSART-1₆₉₀（配列番号4）、およびART-1由来のペプチドであるART-1₁₇₀（配列番号10）の各ペプチドそれぞれをアジュバントと混合して得た3種のワクチンを組合せ使用して6回行った。ついでLck₂₀₈（配列番号1）、Lck₄₈₈（配列番号2）およびSART-1₆₉₀（配列番号4）の各ペプチドそれぞれをアジュバントと混合して得た3種のワクチンを組合せ使用してワクチン接種を続行した。ワクチン接種はペプチドを組合せ使用して行ったが、患者由来PBMCにおいてワクチン接種回数にしたがって各ペプチドに特異的な細胞傷害性T細胞が増加した（図3-A参照。）。

【0019】

別の臨床試験例である慢性リンパ球性白血病患者例（実施例6参照）においては、SART-2由来のペプチドであるSART-2₉₃（配列番号5）、およびSART-3由

来のペプチドであるSART-3109（配列番号8）の各ペプチドそれぞれをアジュバントと混合して得た2種のワクチンを接種した。本臨床例においても、患者由来PBM Cにおいてワクチン接種回数にしたがって各ペプチドに特異的な細胞傷害性T細胞が増加した（図4-Aおよび図4-B参照。）。

【0020】

ペプチドを組合せ使用してワクチン接種したときに各ペプチド特異的な細胞傷害性T細胞が増加したことから、各ペプチドを単独でワクチン接種しても同様にペプチド特異的な細胞傷害性T細胞を誘導でき、さらには臨床効果を得ることができると考える。

【0021】

このように、これらペプチドは単独あるいは2種以上を組合せて本発明に係る造血器腫瘍の予防および／または治療剤の有効成分として使用できる。これら数種のペプチドを例えば癌ワクチンとして用いる場合、選択した数種のペプチドを全て含有する癌ワクチンをワクチン接種に用いることの他、各ペプチドを単独で含有する癌ワクチンを複数種類用いてワクチン接種を実施することが可能である。

【0022】

ワクチン接種に用いた配列番号1、2、4、5、8または10に記載のアミノ酸配列からなるペプチドはいずれも、ワクチン接種前の様々な種類の造血器腫瘍患者由来のPBM Cから、HLA-A24拘束性に細胞傷害性T細胞を誘導したペプチドである。これらの他、Lck486（配列番号3）、SART-2161（配列番号6）、SART-2899（配列番号7）およびSART-3315（配列番号9）が、造血器腫瘍患者由来のPBM CからHLA-A24拘束性に細胞傷害性T細胞を誘導したことから、これらペプチドも造血器腫瘍に対する予防および／または治療剤、例えば癌ワクチンの有効成分として使用できると考える。

【0023】

ワクチン接種においてペプチドとともにワクチンに含有させたアジュバントは、ペプチドによる抗腫瘍免疫応答の誘発をさらに増強することを目的とするものである。抗腫瘍免疫応答を誘発する有効成分はペプチドであり、ペプチドのみの使用によってもインビトロ（in vitro）で細胞傷害性T細胞を誘導できたことから、ペプチドのみを含む医薬も造血器腫瘍の予防および／または治療剤として有効である。アジュバントをともに含有されることによりさらに高い抗腫瘍効果が得られるため、アジュバントの使用がより好みしい。

【0024】

本発明に係る造血器腫瘍の予防および／または治療剤はその1態様において、有効成分として配列番号1、2、3、4、5、6、7、8、9または10に記載のアミノ酸配列からなるペプチドの1つまたは2つ以上をその有効量含有してなる。より好みしくは、配列番号1、2、4、5、8または10に記載のアミノ酸配列からなるペプチドの1つまたは2つ以上を有効成分として含有してなる。配列番号1、2、4、5、8または10に記載のアミノ酸配列からなるペプチドの1つまたは2つ以上に、さらに、配列番号3、6、7または9に記載のアミノ酸配列からなるペプチドを含有することもできる。さらに好みしくは、配列表の配列番号1に記載のアミノ酸配列からなるペプチドおよび／または配列番号2に記載のアミノ酸配列からなるペプチドを有効成分として含有してなる。

【0025】

本発明に係る造血器腫瘍の予防および／または治療剤はまた、抗腫瘍応答を増強可能な補助剤を含むことが可能である。かかる補助剤として例えば、細胞傷害性T細胞の増殖に有効なインターロイキン2等が挙げられる。また、本発明に係る造血器腫瘍の予防および／または治療剤を癌ワクチンとして用いるときは、例えばアジュバントや担体等を補助剤として含むことにより高い抗腫瘍効果が得られる。アジュバントは1種または2種以上を組合せて用いることができる。アジュバントとしては、フロイント完全アジュバント、ミョウバン、リピドA、モノホスホリルリピドA、BCG（Bacillus-Calmette-Guerin）等の細菌製剤、ツベルクリン等の細菌成分製剤、キーホールリ

ンペットヘモシアニンや酵母マンナン等の天然高分子物質、ムラミルトリペプチドまたはムラミルジペプチドまたはそれらの誘導体、アラム (alum) 、非イオン性プロックコポリマー等を挙げることができる。本実施例においてはモンタニドISA-51 (Montanide ISA-51) を用いたが、使用できるアジュバントはこれら具体例に限定されることは無く、アジュバントとしての効果を有する物質である限りにおいていずれを用いてもよい。アジュバントを用いるか否かは、例えばワクチン接種局所の炎症性反応の強さ、あるいはワクチン接種による抗腫瘍効果や被検体由来の末梢血単核細胞の細胞傷害活性の強さを指標にして判断できる。担体は、それ自体が人体に対して有害な作用を及ぼさずかつ抗原性を増強せしめるものであれば特に限定されず、例えばセルロース、重合アミノ酸、アルブミン等が例示される。

【0026】

本発明に係る造血器腫瘍の予防および／または治療剤のより具体的な例として、配列表の配列番号1、2、4、5、8または10に記載のアミノ酸配列からなるペプチドとアジュバントとからなる造血器腫瘍の予防および／または治療剤を挙げることができる。

【0027】

本発明に係る造血器腫瘍の予防および／または治療剤は、上記ペプチドの他、造血器腫瘍に対する抗腫瘍免疫応答を誘発し得る他の抗腫瘍ペプチドをその有効量含むことも可能である。添加する他の抗腫瘍ペプチドは、HLA-A24拘束性に細胞傷害性T細胞を誘導し得るものであることができ、HLA-A24以外の表現型のHLAクラスI拘束性に細胞傷害性T細胞を誘導し得るものであってもよい。好ましくは、癌ワクチンを適用する患者のPBMCからペプチド特異的細胞傷害性T細胞を誘導し得るものが好ましい。ペプチドによるPBMCからの特異的細胞傷害性T細胞の誘導は、PBMCとペプチドとを適当な期間培養し、対応するペプチドをパルスしたHLA-A分子を細胞表面に有する細胞と反応させて、產生されるインターフェロン- γ (IFN- γ) 量を測定することにより評価できる（実施例3参照。）。例えば、IFN- γ 產生量が、ペプチド非存在下で培養したPBMCと比較して多ければ、細胞傷害性T細胞が誘導されたと判断できる。

【0028】

本発明に係る造血器腫瘍の予防および／または治療剤を適用し得る造血器腫瘍は、HLA-A24陽性の造血器腫瘍が好ましく、さらにその有効成分であるペプチドを含む蛋白質、例えばp56^{1-c-k}蛋白質、SART-1、SART-2、SART-3およびART-1のうちの1種以上の発現が認められる造血器腫瘍がより好ましい。「HLA-A24陽性（以下、HLA-A24⁺と称することもある。）」とは、HLA-A24分子を細胞表面上に発現していることを意味する。腫瘍は何らかの原因で異常増殖性を獲得した自己細胞であるため、ほとんどの場合、HLAクラスI表現型がHLA-A24であるヒトにおいては、正常細胞および腫瘍細胞の区別なく、細胞表面上にHLA-A24分子が発現している。HLAクラスI表現型の決定は、造血器腫瘍患者から採取した末梢血単核細胞または造血器腫瘍の一部等を用いて、自体公知の方法に従って行うことができる（非特許文献5）。あるいは簡便には、造血器腫瘍患者から採取した血液を用いて、慣用の血清学的方法により判定することも可能である（非特許文献14）。造血器腫瘍における各種蛋白質の発現の検出は、造血器腫瘍患者から採取した一部の造血器腫瘍について、例えば検出目的の蛋白質に対する抗体を用いたウエスタンプロット法により、あるいは目的の蛋白質をコードする遺伝子のプロモーター転写物のRT-PCRによる検出により実施可能である。

【0029】

造血器腫瘍の具体例としては、成人T細胞白血病 (adult T cell leukaemia、以下ATLと略称する。) ; T細胞急性リンパ球性白血病 (T-cell acute lymphocytic leukaemia、以下T-ALLと略称する。) ; T細胞リンパ腫 (T-cell lymphoma) ; 骨髓性白血病 (myelogenous leukaemia) ; 多発性骨髓腫 (multiple myeloma、以下MMと略称する。) ; 骨髓異形成症候群 (myelodysplastic syndrome)

drōme、以下MDSと略称する。)；急性单球性白血病 (acute monocytic leukemia)；B細胞急性リンパ球性白血病 (B-cell acute lymphocytic leukemia、以下B-ALLと略称する。)；B細胞リンパ腫 (B-cell lymphoma)；バーキットリンパ腫 (Burkitt lymphoma)；および慢性リンパ球性白血病 (chronic lymphocytic leukemia、以下CLLと略称する) 等が例示できるが、これら具体例に制限されることはない。好ましくは、MM、MDS、ATL、T-ALLまたはCLLに、より好ましくはMMまたはCLLに適用し得る。

【0030】

ペプチドの製造は、一般的なアミノ酸の化学合成法により可能である。化学合成法には、通常の液相法および固相法によるペプチド合成法、例えばFmoc法が含まれる。また市販のアミノ酸合成装置を用いて製造可能である。あるいは遺伝子工学的手法により取得することもできる。例えば目的とするペプチドをコードする遺伝子を宿主細胞中で発現できる組換えDNA(発現ベクター)を作成し、これを適当な宿主細胞、例えば大腸菌にトランスフェクションして形質転換した後に該形質転換体を培養し、次いで得られる培養物から目的とするペプチドを回収することにより製造可能である。

【0031】

本発明に係る造血器腫瘍の予防および/または治療剤は、有効成分であるペプチドの他に、アジュバント等の補助剤を含んでなるものであることができ、さらに1種または2種以上の医薬担体を含有することもできる。利用できる医薬担体としては、製剤の使用形態に応じて通常使用される、安定化剤、殺菌剤、緩衝剤、等張化剤、キレート剤、pH調整剤、界面活性剤、充填剤、增量剤、結合剤、付湿剤、崩壊剤、表面活性剤、滑沢剤、無痛化剤、希釈剤あるいは賦形剤等を例示でき、これらは得られる製剤の投与形態に応じて適宜選択使用される。

【0032】

製剤形態は投与形態に応じて選択することができる。代表的な製剤形態としては、溶液剤、乳剤、リポソーム製剤、脂肪乳剤、シクロデキストリン等の包接体、けん渦剤、軟膏剤、クリーム剤、経皮吸収剤、経粘膜吸収剤丸剤、錠剤、丸剤、カプセル剤、散剤、粉末剤、顆粒剤、細粒剤、シロップ剤等の作製も可能であるが、これらに限定されない。これらは更に投与経路に応じて経口剤、非経口剤、経鼻剤、経膣剤、坐剤、舌下剤、吸入剤、点眼剤、点耳剤等に分類され、それぞれ通常の方法に従い、調合、成形ないし調製することができる。また、溶液製剤として使用できる他に、凍結乾燥化し保存し得る状態にした後、用時、水や生理的食塩水等を含む緩衝液等で溶解して適当な濃度に調製した後に使用することも可能である。

【0033】

注射用の溶液は、塩溶液、グルコース溶液、または塩水とグルコース溶液の混合物からなる担体を用いて調製可能である。

【0034】

リポソーム製剤は、例えばリン脂質を有機溶媒(クロロホルム等)に溶解した溶液に、有効成分および/または補助剤や医薬担体等を溶媒(エタノール等)に溶解した溶液を加えた後、溶媒を留去し、これにリン酸緩衝液を加え、振とう、超音波処理および遠心処理した後、上清をろ過処理して回収することにより調製できる。

【0035】

脂肪乳剤化は、例えば当該物質、油成分(大豆油、ゴマ油、オリーブ油等の植物油、MCT等)、乳化剤(リン脂質等)等を混合、加熱して溶液とした後に、必要量の水を加え、乳化機(ホモジナイザー、例えば高圧噴射型や超音波型等)を用いて、乳化・均質化処理して行い得る。また、これを凍結乾燥化することも可能である。なお、脂肪乳剤化するとき、乳化助剤を添加してもよく、乳化助剤としては、例えばグリセリンや糖類(例えばブドウ糖、ソルビトール、果糖等)が例示される。

【0036】

シクロデキストリン包接化は、例えば当該物質を溶媒（エタノール等）に溶解した溶液に、シクロデキストリンを水等に加温溶解した溶液を加えた後、冷却して析出した沈殿をろ過し、滅菌乾燥することにより行い得る。このとき、使用されるシクロデキストリンは、当該物質の大きさに応じて、空隙直径の異なるシクロデキストリン（ α 、 β 、 γ 型）を適宜選択すればよい。

【0037】

懸濁剤は、水、シュークロース、ソルビトール、フラクトース等の糖類、ポリエチレングリコール等のグリコール類、油類を使用して製造できる。

【0038】

その他の剤形についても、通常用いられる方法により調製可能である。

【0039】

製剤中に含有されるべき有効成分の量およびその用量範囲は、特に限定されないが、ペプチドの有効性、投与形態、疾病の種類、対象の性質（体重、年齢、病状および他の医薬の使用の有無等）、および担当医師の判断により適宜選択することが望ましい。一般的には、適当な用量範囲は、例えば1用量当り約0.01 μ g～100mg程度、好ましくは約0.1 μ g～10mg程度、さらに好ましくは1 μ g～1mg程度とするのが望ましい。しかしながら、当該分野においてよく知られた最適化のための一般的な常套的実験を用いてこれらの用量の変更を行うことができる。

【0040】

投与形態は、局所投与または全身投与のいずれも選択することができる。いずれにおいても、疾患、症状等に応じた適当な投与形態を選択する。全身投与は例えば、経口、静脈内、動脈内等への投与により実施できる。局所投与は例えば、皮下、皮内、筋肉内等に投与することができる。

【0041】

その他、患者の末梢血より単核細胞画分を採取して、本発明に係る造血器腫瘍の予防および/または治療剤とともに培養した後に、細胞傷害性T細胞の誘導および/または活性化が認められた該単核細胞画分を患者の血液中に戻すことによっても、有効な抗腫瘍効果効果が得られる。培養するときの単核細胞濃度、造血器腫瘍の予防および/または治療剤の濃度、培養期間等の培養条件は、簡単な繰り返し実験により決定できる。培養時に、インターロイキン-2等のリンパ球増殖能を有する物質を添加してもよい。

【0042】

ワクチン接種を行う場合、皮内、皮下および筋肉内等に注射により局所投与することができる。投与は上記用量を1日1回～数回に分けて行うことができる。ワクチン接種は単回のみ行ってもよいが、同一局所あるいは別の局所に投与を繰り返し行うことが好ましい。例えば、週に1回の割合、あるいは1ヶ月～数ヶ月に1回の割合での間欠的な投与が可能である。より具体的には、2ヶ月に1回の割合で1年以上の長期に亘って投与することができる。癌ワクチンがアジュバントを含まないものである場合、癌ワクチンのみを投与してもよいが、アジュバントを同一局所に投与することが可能である。癌ワクチンがアジュバントを含むものであれば、そのまま局所投与に用いることができる。ワクチン接種のプロトコルは、被検体の症状に応じてワクチン接種の効果を確認しつつ適切な投与量と投与期間を勘案して、個々に適したプロトコルを実施し得る。

【0043】

本発明の別の1態様は、治療に有効な用量の配列番号1、2、3、4、5、6、7、8、9または10に記載のアミノ酸配列からなる各ペプチドを投与することを特徴とする、造血器腫瘍の予防および/または治療方法である。投与するペプチドは、より好ましくは配列表の配列番号1、2、4、5、8または10に記載のアミノ酸配列からなるペプチドである。これら各ペプチドは、アジュバントとともに投与することがさらに好ましい。またこれらペプチドは、その2つ以上を組合せてアジュバントとともに投与することもできる。本発明に係る造血器腫瘍の予防および/または治療方法を適用し得る造血器腫瘍は、HLA-A24陽性の造血器腫瘍が好ましく、さらに該方法において投与するペプチド

を含む蛋白質、例えばp56^{1-c-k}蛋白質、SART-1、SART-2、SART-3およびART-1のうちの1種以上の発現が認められる造血器腫瘍がより好ましい。

【0044】

以下、本発明を実施例に基づき具体的に説明するが、本発明は下記の実施例に限定されない。

【0045】

実験例に記載した全ての実験は、試料提供者である患者のインフォームドコンセントを得て行なったものである。ペプチドワクチン療法の臨床検討は、久留米大学倫理委員会の承認を受けた臨床プロトコール（プロトコール番号：2031）に従い、患者のインフォームドコンセントを得て実施した。

【実施例1】

【0046】

（ワクチン接種に用いたペプチドの調製1）

臨床検討に用いたペプチドは、p56^{1-c-k}蛋白質由来のペプチドであるLck₂₀₈（配列番号1）およびLck₄₈₈（配列番号2）、SART-1由来のペプチドであるSART-1₆₉₀（配列番号4）、並びにART-1由来のペプチドであるART-1₁₇₀（配列番号10）である。これらペプチドは、マルチルペプチドシステム（Multiple Peptide System）社のグッドマニュファクチャーリングプラットフォーム（Good Manufacturing Practice）の条件に基づいて調製した。

【0047】

アジュバントは、モンタニド ISA-51（Montanide ISA-51）アジュバント（セピック社製）を用いた。

【0048】

各ペプチドについて、その3mgを滅菌生理食塩水とともにMontanide ISA-51に1：1容量で添加し、ボルテックスミキサーで攪拌し、乳剤を調製した。かくして、Lck₂₀₈（配列番号1）、Lck₄₈₈（配列番号2）、SART-1₆₉₀（配列番号4）またはART-1₁₇₀（配列番号10）を含む4種類の乳剤を得た。

【実施例2】

【0049】

（造血器腫瘍における上皮癌関連抗原発現の測定）

上皮癌関連抗原であるp56^{1-c-k}蛋白質およびART-1、並びにSART-1、SART-2、SART-3の発現を、一連の造血器腫瘍細胞株について検討した。検討には次の細胞株を用いた：B細胞急性リンパ球性白血病（B-ALL）細胞株であるREH、HALL1、NALM6、NALM16、KOPN-K、BALM1-2およびBALL-1；T-細胞急性リンパ球性白血病（T-ALL）細胞株であるKOPT、RPMI-8402、CCRF-CEM、HPB-ALL、MOLT-4、CCRF-HSB-2およびPEER；急性骨髓性白血病細胞株であるML1、ML2、ML3およびKG1；急性単球性白血病細胞株であるTHP-1およびU-937；バーキットリンパ腫細胞株であるRAJIおよびNAMALWA；慢性骨髓性白血病細胞株であるNALM1およびK562；多発性骨髓腫（MM）細胞株であるARH-77、U-266、KHM-11、MIK-1およびRPMI-8226；それぞれB細胞リンパ腫細胞株、T細胞リンパ腫細胞株および赤白血病細胞株であるBHL-89、HuT-102およびHEL；並びに成人T細胞白血病（ATL）細胞株であるHPB-MLT。これら細胞株は全て、10%牛胎児血清（FCS）を含むRPMI1640培地（Gibco BRL）中で維持培養した。

【0050】

各細胞株におけるp56^{1-c-k}蛋白質、SART-1およびSART-2の発現を、抗p56^{1-c-k}蛋白質モノクローナル抗体（Lck3A5、Santa Cruz Biotech）、抗SART-1ポリクローナル抗体および抗SART-2ポリクローナル抗体

を用いてウエスタンプロット法により検出した。さらに、Cell Questソフトウェア (Becton Dickinson) を用いてフローサイトメトリーにより p56^{1 c k} 蛋白質およびSART-3の発現を分析した。細胞内染色は、細胞を 4% パラホルムアルデヒドと 0.1% サポニンで前処理し、ついで抗 p56^{1 c k} 蛋白質モノクローナル抗体、および抗SART-3モノクローナル抗体を添加することにより行った。二次抗体として、FITC結合抗マウス IgG 抗体 (ICN Biomedicals) を用いた。

【0051】

1ck 遺伝子プロモーターには異なった2つの型が知られており、腫瘍細胞および正常末梢血単核細胞においてはそれぞれI型およびII型が主に使用されている（非特許文献12）。そこで、1ck 遺伝子の2つのプロモーターの検出を、特異的プライマー対を用いてRT-PCRにより常法に従って行った（非特許文献12）。試料として用いた総RNAは、細胞からRNA-Bee (TEL-TEST) を用いて抽出した。cDNAはスーパースクリプトファーストストランドシンセシスシステム (Invitrogen) を用いて調製した。PCRはタックDNAポリメラーゼ (Taq DNA polymerase) を用いてDNAサイクラー (iCycler, Bio-Rad Laboratories) 中で30サイクル (94°Cで1分間、60°Cで2分間および72°Cで1分間) 実施した。

【0052】

ART-1 遺伝子のmRNA発現の検出は、常法に従ってノザンプロット分析により行った（非特許文献6）。コントロールプローブとしてヒトβアクチンcDNA (Clontech) を用いた。

【0053】

p56^{1 c k} 蛋白質の発現は、ウェスタンプロット法による分析において、HPB-MLT 白血病細胞株およびARH-77骨髄腫細胞株、PBMC およびPHA芽球化T細胞 (PHA-blastoid T cell) で認められた（図1-A）。また、1ck 遺伝子プロモーターの分析により、HPB-MLT、PEER およびML-2は両方のプロモーターを用いており、一方BALL-1、GHL-89 およびRAJIはI型プロモーターのみを使用していることが判明した（図1-B）。検討に用いた造血器腫瘍細胞株のほとんどが p56^{1 c k} 蛋白質を発現していることが明らかになった。

【0054】

SART-1、SART-2 およびSART-3 はいずれも試験した全ての造血器腫瘍細胞株において発現していたが、PBMC では発現が認められなかった。

【0055】

ART-1 は試験した全ての造血器腫瘍細胞株およびPBMC で発現していたが、ほとんどの細胞株でPBMC より高い発現が認められた。

【0056】

これら蛋白質の造血器腫瘍株における発現検討結果を表1に示した。

【0057】

【表1】

試料	SART-1	SART-2	SART-3	ART-1	Lck	Lck (I型/II型)			
						-/-	+/-	-/+	+/+
ATL	1/1	1/1	1/1	NT	1/1	0/1	0/1	0/1	1/1
T-ALL	1/1	2/2	7/7	2.0	2/2	0/2	0/2	0/2	2/2
B-ALL	2/2	4/4	6/6	NT	1/2	0/2	2/2	0/2	0/2
ブリンパ腫	1/1	1/1	1/1	NT	NT	0/1	1/1	0/1	0/1
形質細胞腫	5/5	5/5	2/2	2.8	3/5	1/4	2/4	0/4	1/4
AML	2/2	5/5	7/7	1.4	1/5	3/4	0/4	0/4	1/4
CLL	1/1	NT	2/2	NT	NT	NT	NT	NT	NT
CML	NT	NT	2/2	4.6	NT	NT	NT	NT	NT
バーキットリンパ腫	NT	2/2	1/1	2.8	2/2	0/2	2/2	0/2	0/2
PBMC	0/2	0/2	2/2	1.0	2/2	0/2	0/2	2/2	0/2
PHA芽球化細胞	2/2	0/2	2/2	NT	2/2	0/2	2/2	0/2	0/2

【実施例3】

【0058】

(上皮癌関連抗原ペプチドによる造血器腫瘍患者PBMCからの細胞傷害性T細胞誘導)
造血器腫瘍患者PBMCからのペプチド特異的細胞傷害性T細胞の誘導を、既報に従って行った(非特許文献5)。

【0059】

細胞傷害性T細胞の誘導には次のペプチドを用いた: p56^{1-c-k}蛋白質由来ペプチドであるLck₂₀₈(配列番号1)、Lck₄₈₈(配列番号2)およびLck₄₈₆(配列番号3); SART-1由来ペプチドであるSART-1₆₉₀(配列番号4); SART-2由来ペプチドであるSART-2₉₃(配列番号5)、SART-2₁₆₁(配列番号6)およびSART-2₈₉₉(配列番号7); SART-3由来ペプチドであるSART-3₁₀₉(配列番号8)およびSART-3₃₁₅(配列番号9); 並びにART-1由来ペプチドであるART-1₁₇₀(配列番号10)。これらはいずれも上皮癌関連抗原由来ペプチドであり、HLA-A24拘束性細胞傷害性T細胞を上皮癌患者のPBMCから誘導する能力を有する(非特許文献3~6および12)。HLA-A24結合モチーフを有する陰性コントロールペプチドおよび陽性コントロールペプチドとして、それぞれHIV由来ペプチド(配列番号11)およびEBV由来ペプチド(配列番号12)を用いた。ペプチド(純度95%以上)は全てサワディーラボラトリーから購入し、それぞれジメチルスルホキシドに10mg/mlの濃度で溶解して使用した。

【0060】

PBMCは、造血器腫瘍患者から採取した末梢血より、フィコールコンレイ密度勾配遠心法により末梢血単核細胞を調製した。該細胞上のHLA-A24分子発現の測定は、フローサイトメトリーを用いて公知方法に従って行った(非特許文献5)。

【0061】

試験方法を以下に簡便に述べる。まず、PBMC(細胞数1×10⁵/well)を各ペプチド10μMとともに96ウェルU底型マイクロカルチャープレート(Nunc)において200μlの培養培地中でインキュベーションした。培養培地の組成は、4.5% RPMI-1640、4.5% AIM-V(Invitrogen)、10% FCS、100U/mlのインターロイキン2(IL-2)、および0.1mM MEMノンエンゼンシャルアミノアシッドソリューション(Invitrogen)からなる。培養3日目、6日目および9日目に、培地の半量を除去し、対応するペプチド(20μg/ml)を含む新鮮培地と交換した。培養12日目に細胞を回収し、対応するペプチドまたは陰性コントロールであるHIV由来ペプチド(配列番号11)を前もってパルスしたHLA-A24発現C1R細胞(以下、C1R-A24と呼称する。)に対する反応におけるIFN-γの産生能を試験した。HIV由来ペプチド(配列番号11)に対する反応において産生されたIFN-γをバックグラウンドとして、データの値から減算した。対応するペプチドに対する反応においてペプチドで刺激されたPBMCにより産生されたIFN-γの

平均値が、HIV由来ペプチド（配列番号11）に対する反応において産生されたものより高い場合、ペプチド特異的細胞傷害性T細胞前駆体がPBMCに存在し、ペプチドによりペプチド特異的細胞傷害性T細胞が誘導されたと判定した。

【0062】

細胞傷害性T細胞誘導の検討は、HLA-A24⁺造血器腫瘍患者10例〔CLL2例、リンパ腫であるマントル細胞リンパ腫（MCL）1例および非ホジキンリンパ腫（NHL）1例、B-ALL1例、MM1例、MDS1例、ATL2例、およびT-ALL1例〕のPBMCについて、p56^{1 c k}蛋白質、SART-1、SART-2、SART-3およびART-1由来のペプチドを用いて行った。用いたペプチドは、HLA-A24⁺上皮癌患者のPBMCからペプチド特異的腫瘍反応性細胞傷害性T細胞を誘導したペプチドであり、現在、上皮癌患者に対するワクチンとして臨床試験を行っている。該ペプチドでインビトロにてPBMCを刺激し、ペプチド特異的IFN- γ 産生を測定した結果を表2に示した。表中、NDとは試験を行わなかったことを示す。

【0063】

【表2】

ペプチド	配列番号	患者										反応例/例数
		#1 CLL	#2 CLL	#3 MCL	#4 NHL	#5 B-ALL	#6 MM	#7 MDS	#8 ATL	#9 ATL	#10 T-ALL	
SART-1 ₆₉₀	4	0	486	0	103	8	141	0	55	155	26	4/10
SART-2 ₉₃	5	0	440	9	103	20	28	0	0	354	192	4/10
SART-2 ₁₆₁	6	0	177	49	1303	0	28	0	0	198	227	4/10
SART-2 ₈₉₉	7	0	15	12	220	0	0	0	12	346	526	3/10
SART-3 ₁₀₉	8	49	0	7	0	0	0	11	49	0	0	0/10
SART-3 ₃₁₅	9	39	137	6	0	11	0	0	22	60	6	1/10
Lck ₂₀₈	1	0	2	22	30	0	0	0	0	445	153	2/10
Lck ₄₈₆	3	0	0	0	0	0	0	0	140	2099	140	3/10
Lck ₄₈₈	2	0	0	0	0	6	182	102	476	304	0	4/10
ART-1 ₁₇₀	10	501	33	0	0	0	94	0	69	1487	3	2/10
HIV	11	0	71	8	0	0	0	9	0	0	2	0/10
EBV	12	0	100	0	1788	0	418	115	264	264	0	6/10

【0064】

Lck₂₀₈（配列番号1）、Lck₄₈₆（配列番号3）およびLck₄₈₈（配列番号2）により刺激したPBMCによるIFN- γ 産生の促進が、それぞれ10例中2例、3例および4例で認められた。Lck₂₀₈（配列番号1）は、ATL1例およびT-ALL1例、Lck₄₈₆（配列番号3）はATL2例およびT-ALL1例、Lck₄₈₈（配列番号2）はMM1例、MDS1例、およびATL2例のPBMCによるIFN- γ 産生を促進した。一方、陽性コントロールであるEBV由来ペプチド（配列番号12）による刺激では10例中6例でPBMCによるIFN- γ 産生の促進が認められたが、陰性コントロールであるHIV由来ペプチド（配列番号11）では全ての例でIFN- γ 産生が認められなかった。

【0065】

上記試験においてペプチドとのインキュベーションにより該ペプチドをパルスしたC1R-A24に対するIFN- γ 産生が促進されたPBMCについて、さらにIL-2（100U/ml）のみの存在下で2週間培養し、造血器腫瘍細胞株に対する細胞傷害活性を標準的な⁵¹Cr遊離試験（非特許文献5）により検討した。すなわち、得られたPBMCをエフェクターとして用い、⁵¹Cr標識した標的細胞（以下、ターゲットと称する）と、エフェクター/ターゲット比3、10または30で混合して6時間インキュベーションした後に、上清中に遊離された⁵¹Crの放射活性を測定した。得られた結果は、ターゲットを完全に溶解したときの放射活性を100%として算出した%溶解（%lysis）で表した。ターゲットとして、HLA-A24⁺造血器腫瘍細胞株であるPEER、HLA-A24⁻造血器腫瘍細胞株であるHPB-MLTおよびHLA-A24⁺PHA芽

球化T細胞を用いた。

【0066】

代表的な結果を図2-A、図2-Bおよび図2-Cに示す。Lck486（配列番号3）、SART-2161（配列番号6）またはSART-2899（配列番号7）で刺激し、さらにIL-2存在下で培養したPBMC（それぞれ表2における患者#8、患者#2、患者#4）はいずれも、HLA-A24⁺造血器腫瘍株に対して有意に細胞傷害活性を示したが、HLA-A24⁻造血器腫瘍株またはHLA-A24⁺PHA芽球化T細胞に対しては細胞傷害活性を示さなかった（それぞれ図2-A、図2-B、図2-C）。かかる細胞傷害活性は、HIV由来ペプチド（配列番号11）またはEBV由来ペプチド（配列番号12）で培養したPBMCには認められなかった。これらから、Lck486（配列番号3）、SART-2161（配列番号6）およびSART-2899（配列番号7）は造血器腫瘍患者のPBMCからHLA-A24拘束性に腫瘍特異的細胞傷害性T細胞を誘導し得ることが明らかになった。

【実施例4】

【0067】

（造血器腫瘍患者における癌ワクチン接種の検討1）

臨床試験を実施した患者（表2における患者#6）は、74歳のHLA-A24⁺男性患者であり、デュリーアンドサーモン分類法（Durie & Salmon's classification）によりステージI IIに分類されたIgAタイプ多発性骨髄腫を罹患していた。該患者は、本臨床試験参加以前に一連の化学療法を多回数受け、化学療法耐性を獲得していた。しかし、ペプチドワクチン接種以前の4週間は、化学療法、またはステロイドや他の如何なる免疫抑制剤の投与も受けていない。

【0068】

患者骨髄由来CD38⁺多発性骨髄腫細胞（MM細胞）上にHLA-A24分子が発現していることは、抗HLA-A24モノクローナル抗体を用いてフローサイトメトリーにより確認した。さらに、これらCD38⁺MM細胞がLck蛋白質を発現していることは、抗Lck抗体を用いて同様に確認した。

【0069】

ワクチン接種に用いたペプチドは、ワクチン接種前の該患者由来のPBMCにおいてインビトロで細胞傷害性T細胞を誘導し得たペプチドであるLck488（配列番号2）、SART-1由来のペプチドであるSART-1690（配列番号4）、並びにART-1由来のペプチドであるART-1170（配列番号10）を用いた。これらペプチドによりインビトロで細胞傷害性T細胞が誘導されたことから、該患者のPBMCには、これらペプチドに対して反応し得るペプチド特異的細胞傷害性T細胞前駆体が存在していると考えられる。

【0070】

これら各ペプチドを含む3種類の乳剤を実施例1記載の方法で調製し、患者の大腿側面のそれぞれ別の部位に皮下注射することによりワクチン接種を行った。ペプチドのワクチン接種前に皮膚試験を行い、患者が即時型過敏反応を示さないことを確認した後にワクチン接種を行った。皮膚試験は、生理食塩水中50μgの各ペプチドを皮内注射することにより行い、注射20分後または24時間後に即時型過敏反応または遅延型過敏反応をそれぞれ観察した。

【0071】

該患者は、SART-1690（配列番号4）、Lck488（配列番号2）およびART-1170（配列番号10）を用いて、2ヶ月間隔で7回ワクチン接種した。6回目のワクチン接種後に得たPBMCにおいて、SART-1690（配列番号4）、Lck488（配列番号2）およびLck208（配列番号1）それぞれに対するペプチド特異的細胞傷害活性が実施例3記載のインビトロ試験により観察された。そこで、8回目以降のワクチン接種には、SART-1690（配列番号4）、Lck488（配列番号2）またはLck208（配列番号1）を含む3種の乳剤を実施例1記載の方法で調製して用

いた。

【0072】

ワクチン接種後に毎回、患者由来のPBMCについて、用いたペプチド特異的な細胞傷害活性を、該ペプチドをパルスしたC1R-A24細胞を用いて⁵⁻¹Cr遊離試験により測定した。その結果、ワクチン接種回数にしたがってペプチド特異的な細胞傷害活性が増強されたことが明らかになった（図3-A）。3回目、6回目および9回目のワクチン接種の後にPBMCを採取し、骨髄腫細胞株に対する細胞傷害活性を試験したところ、該PBMCはHLA-A24⁺骨髄細胞株KHM-11およびMIK-1に対して有意なレベルの細胞傷害活性を示した（図3-B）。一方、HLA-A24⁻骨髄細胞株RPMI-8226に対する細胞傷害活性は非常に低かった。これら細胞傷害活性は抗HLAクラスI抗体（W6/32、IgG2a）、抗CD8抗体（Nu-Ts/c、IgG2a）または抗HLA-A24抗体（A11.1、IgG3）により有意に阻害されたが、抗CD14抗体（JML-H14、IgG2a）によっては阻害されなかった。

【0073】

これらから、ペプチドのワクチン接種により多発性骨髄腫患者の血液中において、HLA-A24拘束性腫瘍特異的細胞傷害性T細胞が誘導されたことが明らかになった。

【0074】

臨床反応については、骨髄検査により形質細胞が46%減少したことが判明し（ワクチン接種前46.6×10⁴/μlから6回目のワクチン接種後には21.5×10⁴/μlに減少した。）、安定状態（stable condition）は9ヶ月以上継続した。

【0075】

ワクチン接種の副作用は、投与部位において局所的反応が認められたのみ（グレードI）であり、これに対する治療の必要がない程度であった。ワクチン接種に用いたペプチドに対する遅延型過敏反応は全く観察されなかった。また、本例においては、自己免疫反応を示す症状は認められなかった。

【0076】

これらから、上記ペプチドのワクチン接種が、造血器腫瘍の治療に有効であり、副作用も極めて少ないことが明らかになった。

【実施例5】

【0077】

（ワクチン接種に用いたペプチドの調製2）

SART-2由来のペプチドであるSART-2₉3（配列番号5）およびSART-3由来のペプチドであるSART-3₁₀9（配列番号8）について、実施例1と同様のアジュバントを用いて同様の方法で2種類の乳剤を調製した。

【実施例6】

【0078】

（造血器腫瘍患者における癌ワクチン接種の検討2）

臨床試験を実施した患者（表2における患者#1）は、63歳のHLA-A24⁺女性患者であり、バーネット分類法（Bernet's classification）によりステージAに分類された慢性リンパ球性白血病を罹患していた。該患者は、本臨床試験開始時に、白血球数増加および血小板数減少の進行が認められた。

【0079】

患者PBMC由来CD19⁺慢性リンパ球性白血病細胞（CLL細胞）上にHLA-A24分子が発現していることは、抗HLA-A24モノクローナル抗体を用いてフローサイトメトリーにより確認した。

【0080】

ワクチン接種前の該患者由来のPBMCにおいてインビトロで細胞傷害性T細胞を誘導し得たペプチドであるART-1₁₇0（配列番号10）は、ワクチン接種前に行った皮膚試験（実施例4参照。）において即時型過敏反応を惹起したため、SART-2由来の

ペプチドである SART-2₉3 (配列番号5)、並びにSART-3₁₀9 (配列番号8)をワクチン接種に用いた。これらペプチドに対して反応するイムノグロブリンG抗体が有意に高いレベルでワクチン前の血清中に検出されたことから、該患者においてワクチン前にこれらペプチドに対する液性免疫が惹起されていることが判明した。上皮癌患者におけるペプチドワクチンの臨床試験において、患者の生存率とワクチンに用いたペプチドに対する液性免疫応答の亢進とがよく相関していたことから、これらペプチドが本患者に有効に作用すると考えた。

【0081】

これらペプチドを用いて実施例5で調製した2種類の乳剤を患者の大腿側面のそれぞれ別の部位に皮下注射することによりワクチン接種を行った。

【0082】

ワクチン接種後に毎回、患者由来のPBMCについて、用いたペプチド特異的な細胞傷害T細胞の誘導を、該ペプチドをパルスしたC1R-A24細胞に対するIFN- γ の産生量を指標にして測定した (実施例3参照。)。その結果、ワクチン接種回数にしたがつてIFN- γ 産生量が増加した (図4-A)。PBMCによるIFN- γ 産生は、抗CD8抗体 (Nu-Ts/c、IgG2a) または抗HLA-A24抗体 (A11.1、IgG3) により有意に阻害されたが、抗CD14抗体 (JML-H14、IgG2a) によつては阻害されなかつた。これらから、ワクチン接種により、ペプチド反応性細胞傷害性T細胞が誘導されたことが明らかになつた。さらに、これらペプチド反応性細胞傷害性T細胞は、SART-2₉3 (配列番号5) またはSART-3₁₀9 (配列番号8) をパルスしたC1R-A24細胞に対して、HIV由来ペプチド (配列番号11) をパルスした細胞に対するよりも高い細胞傷害活性を示すことが⁵ ¹Cr遊離試験により判明した (図4-B)。

【0083】

これらから、ペプチドのワクチン接種により慢性リンパ球性白血病患者の血液中において、HLA-A24拘束性のペプチド特異的細胞傷害性T細胞が誘導されたことが明らかになつた。

【0084】

臨床反応については、ワクチン接種前 $20 \times 10^3 / \mu\text{l}$ であった血中リンパ球数が、6回目のワクチン接種後に一時的ではあるが $12.8 \times 10^3 / \mu\text{l}$ に著しく減少した。血小板数は、ワクチン接種前には $10 \times 10^4 / \mu\text{l}$ と低かったが、6回目のワクチン接種後には増加し、17回のワクチン接種期間を通して正常範囲内に保たれていた。

【0085】

ワクチン接種の副作用は、投与部位において局所的反応が認められた (グレードI)。また、3回目のワクチン接種後にSART-3₁₀9 (配列番号8)に対する遅延型過敏反応が観察されたが、副作用は極めて少なかつた。

【産業上の利用可能性】

【0086】

本発明に係る造血器腫瘍の予防および/または治療剤は、造血器腫瘍の特異的免疫療法に用いることができ、医薬分野における利用可能性が非常に高く有用である。

【図面の簡単な説明】

【0087】

【図1-A】一連の細胞株におけるp56^{1 c k}蛋白質の発現を、抗p56^{1 c k}モノクローナル抗体を用いたウエスタンプロット法で検出した結果を示す図である。ATL細胞株であるHPB-MLTおよび骨髄腫細胞株であるARH-77において高い発現が認められた。正常細胞であるPBMCおよびPHA芽球化T細胞においても発現が認められた。

【図1-B】一連の細胞株における1c k遺伝子の2つの異なるプロモーター転写物の発現をRT-PCRにより検出した結果を示す図である。ATL細胞株であるHPB-MLTおよびPEER、骨髄性白血病細胞株ML-2ではI型およびII型の

両方のプロモーター転写物が認められた。バーキットリンパ腫細胞株R A J I、B細胞白血病細胞株B A L L - 1、リンパ腫細胞株B H L - 8 9 および多発性骨髄腫細胞株R P M I - 8 2 2 6 ではI型のプロモーター転写物のみが認められた。一方、正常細胞であるP B M C ではI I型のプロモーター転写物のみが検出された。G A P D H (g l y c e r a l d e h y d e - 3 - p h o s p h a t e d e h y d r o g e n a s e) の発現は、R T - P C R のコントロールとして測定した。

【図2-A】A T L患者（表2における患者# 8）由来P B M Cが、ペプチドL c k_{4 8 6}（配列番号3）を用いてインビトロで刺激した後に、H L A - A 2 4⁺ A T L細胞株P E E Rに対して細胞傷害活性（図中、% l y s i sで表示。）を示したが、H L A - A 2 4⁻腫瘍細胞株および正常細胞であるH L A - A 2 4⁺ P H A芽球化T細胞に対しては細胞傷害活性を示さなかつことを説明する図（右パネル）である。一方、H I V由来ペプチド（配列番号11）で刺激したP B M Cは細胞傷害活性を示さなかつ（左パネル）。

【図2-B】C L L患者（表2における患者# 2）由来P B M Cが、ペプチドS A R T - 2 1 6 1（配列番号6）を用いてインビトロで刺激した後に、H L A - A 2 4⁺ A T L細胞株R E Hに対して細胞傷害活性（図中、% l y s i sで表示。）を示したが、H L A - A 2 4⁻腫瘍細胞株および正常細胞であるH L A - A 2 4⁺ P H A芽球化T細胞に対しては細胞傷害活性を示さなかつことを説明する図（右パネル）である。一方、E B V由来ペプチド（配列番号12）で刺激したP B M Cは細胞傷害活性を示さなかつ（左パネル）。

【図2-C】N H L患者（表2における患者# 4）由来P B M Cが、ペプチドS A R T - 2 8 9 9（配列番号7）を用いてインビトロで刺激した後に、H L A - A 2 4⁺ A T L細胞株R E Hに対して細胞傷害活性（図中、% l y s i sで表示。）を示したが、H L A - A 2 4⁻腫瘍細胞株および正常細胞であるH L A - A 2 4⁺ P H A芽球化T細胞に対しては細胞傷害活性を示さなかつことを説明する図（右パネル）である。一方、E B V由来ペプチド（配列番号12）で刺激したP B M Cは細胞傷害活性を示さなかつ（左パネル）。

【図3-A】多発性骨髄腫患者（表2における患者# 6）由来P B M Cにおいて、L c k_{2 0 8}（配列番号1）、L c k_{4 8 8}（配列番号2）またはA R T - 1 1 7 0（配列番号10）とインキュベーションすることにより誘導される、対応する各ペプチドをパルスしたC 1 R - A 2 4細胞に対する細胞傷害活性（図中、% l y s i sで表示。）がペプチドワクチン接種の回数にしたがって増強されたことを説明する図である。

【図3-B】多発性骨髄腫患者（表2における患者# 6）由来P B M Cにおいて、H L A - A 2 4⁺多発性骨髄腫細胞株K H M - 1 1 およびM I K - 1に対する細胞傷害活性（図中、% l y s i sで表示。）がペプチドワクチン接種の回数にしたがって増強されたことを説明する図である。一方、ペプチドワクチン接種によつても、H L A - A 2 4⁻多発性骨髄腫細胞株R P M I - 8 2 2 6 に対する細胞傷害活性は認められなかつ。

【図4-A】慢性リンパ球性白血病患者（表2における患者# 1）由来P B M Cにおいて、S A R T - 2 9 3（配列番号5）またはS A R T - 3 1 0 9（配列番号8）をパルスしたC 1 R - A 2 4細胞に対する反応におけるI F N - γ 产生促進がペプチドワクチン接種の回数にしたがって増強されたことを説明する図である。

【図4-B】慢性リンパ球性白血病患者（表2における患者# 1）由来P B M Cが、ワクチン接種後に、S A R T - 2 9 3（配列番号5）またはS A R T - 3 1 0 9（配列番号8）をパルスしたC 1 R - A 2 4細胞に対してH I V由来ペプチドをパルスした細胞よりも高い細胞傷害活性を示したことを説明する図である。

【配列表フリーテキスト】

【0088】

配列番号1：p 5 6¹ c^k 蛋白質の部分ペプチド。

配列番号2：p56¹c^k 蛋白質の部分ペプチド。
配列番号3：p56¹c^k 蛋白質の部分ペプチド。
配列番号4：SART-1の部分ペプチド。
配列番号5：SART-2の部分ペプチド。
配列番号6：SART-2の部分ペプチド。
配列番号7：SART-2の部分ペプチド。
配列番号8：SART-3の部分ペプチド。
配列番号9：SART-3の部分ペプチド。
配列番号10：ART-1の部分ペプチド。
配列番号11：ヒト免疫不全ウイルス由来ペプチド。
配列番号12：エプスタインバーウイルス由来ペプチド。

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Itoh, Kyogo

<120> Composition for preventing and/or treating hematological malignancy

<130> NP03-1109

<160> 12

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Partial peptide of p56lck protein

<400> 1

His Tyr Thr Asn Ala Ser Asp Gly Leu

1 5

<210> 2

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Partial peptide of p56lck protein

<400> 2

Asp Tyr Leu Arg Ser Val Leu Glu Asp Phe

1 5 10

<210> 3

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Partial peptide of p56lck protein

<400> 3

Thr Phe Asp Tyr Leu Arg Ser Val Leu
1 5

<210> 4
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Partial peptide of SART-1

<400> 4

Glu Tyr Arg Gly Phe Thr Gln Asp Phe
1 5

<210> 5
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Partial peptide of SART-2

<400> 5

Asp Tyr Ser Ala Arg Trp Asn Glu Ile
1 5

<210> 6
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Partial peptide of SART-2

<400> 6

Ala Tyr Asp Phe Leu Tyr Asn Tyr Leu
1 5

<210> 7
<211> 9
<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Partial peptide of SART-2

<400> 7.

Ser Tyr Thr Arg Leu Phe Leu Ile Leu
1 5

<210> 8

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Partial peptide of SART-3

<400> 8

Val Tyr Asp Tyr Asn Cys His Val Asp Leu
1 5 10

<210> 9

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Partial peptide of SART-3

<400> 9

Ala Tyr Ile Asp Phe Glu Met Lys Ile
1 5

<210> 10

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Partial peptide of ART-1

<400> 10

Glu Tyr Cys Leu Lys Phe Thr Lys Leu

1

5

<210> 11
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Human Immunodeficiency Virus-derived peptide

<400> 11

Arg Tyr Leu Arg Asp Gln Gln Leu Leu Gly Ile
1 5 10

<210> 12
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

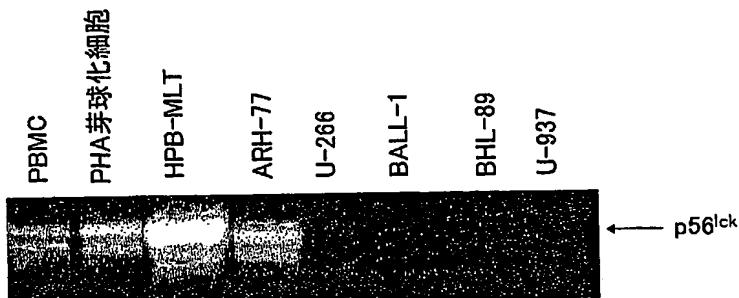
<220>
<223> Epstein-Barr-Virus-derived peptide

<400> 12

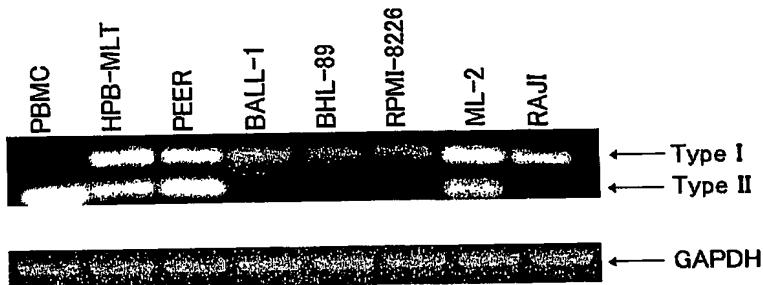
Thr Tyr Gly Pro Val Phe Met Cys Leu
1 5

【書類名】図面

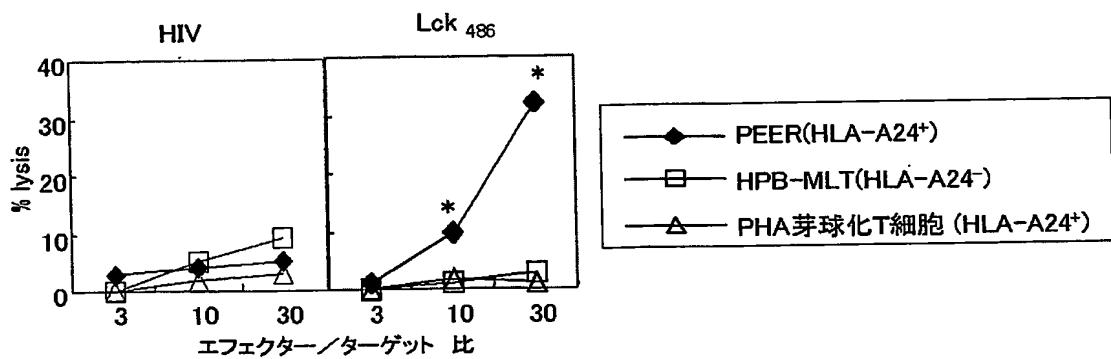
【図1-A】



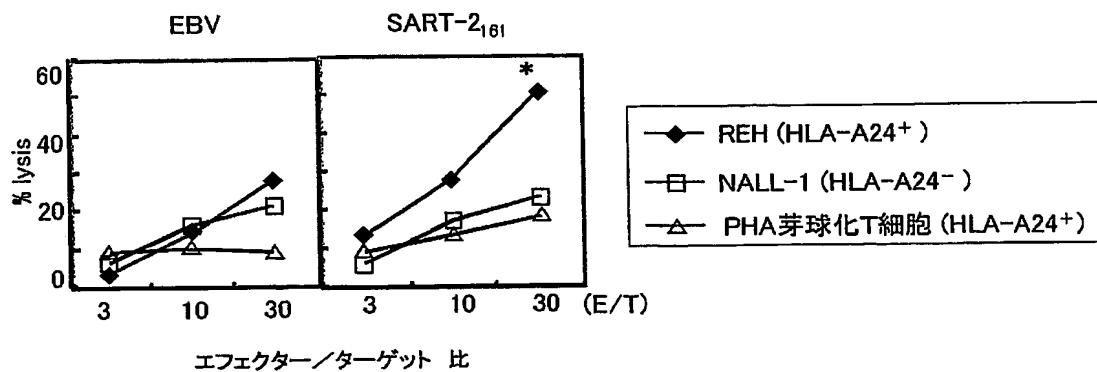
【図1-B】



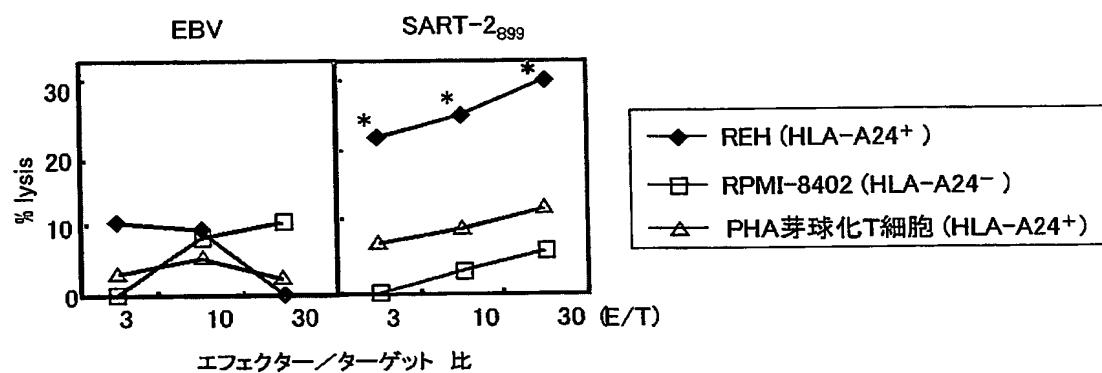
【図2-A】



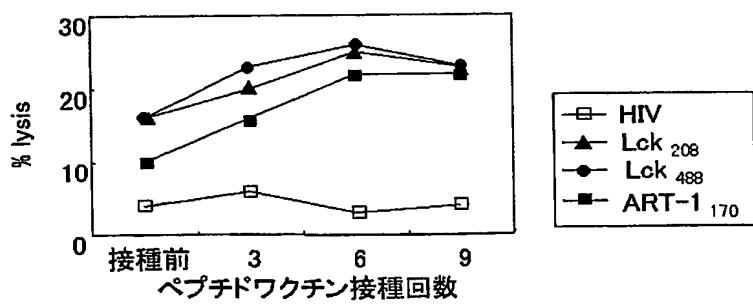
【図2-B】



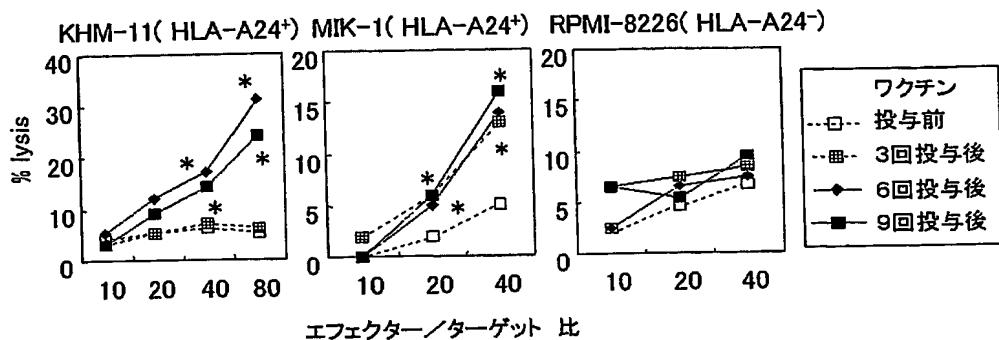
【図2-C】



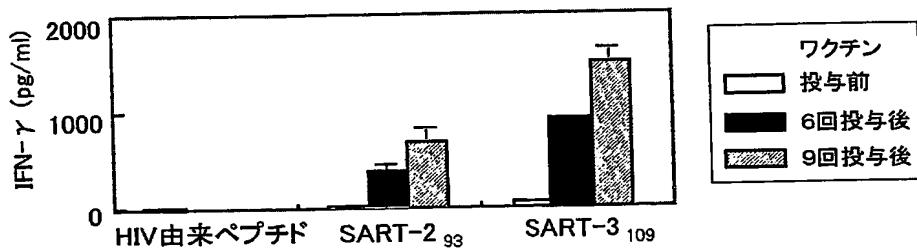
【図3-A】



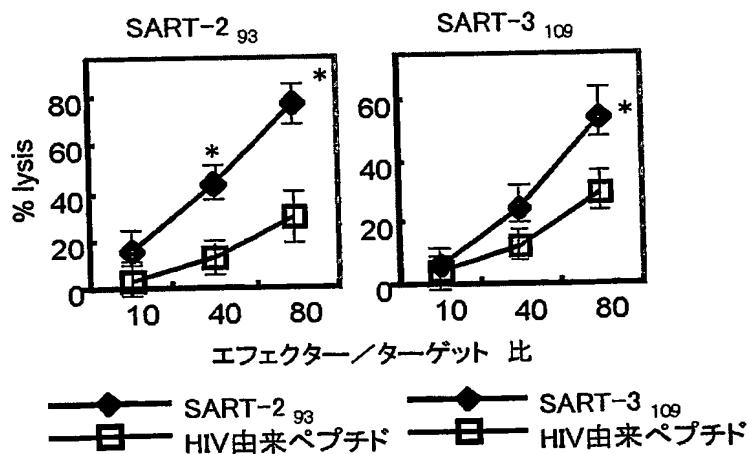
【図3-B】



【図4-A】



【図4-B】



【書類名】要約書

【要約】

【課題】 造血器腫瘍の特異的免疫療法に有用な標的分子を見出し、造血器腫瘍の予防および／または治療を可能にする手段を提供することを課題とする。

【解決手段】 配列表の配列番号1から10のいずれか1に記載のアミノ酸配列からなるペプチドの少なくとも1つを有効成分として含有する造血器腫瘍の予防および／または治療剤、アジュバントをさらに含む前記造血器腫瘍の予防および／または治療剤、造血器腫瘍用癌ワクチンとして使用する前記予防および／または治療剤を提供することにより、造血器腫瘍、例えばHLA-A24陽性造血器腫瘍またはHLA-A24陽性であり且つ前記ペプチドを含む蛋白質を発現している造血器腫瘍の予防および／または治療を可能にした。

認定・付加情報

特許出願の番号	特願2003-287208
受付番号	50301299365
書類名	特許願
担当官	田丸 三喜男 9079
作成日	平成15年 8月 7日

<認定情報・付加情報>

【提出日】 平成15年 8月 5日

特願 2003-287208

出願人履歴情報

識別番号

[596094371]

1. 変更年月日

1996年 6月 7日

[変更理由]

新規登録

住 所

佐賀県三養基郡基山町けやき台2-25-9

氏 名

伊東 恭悟